

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 590 273**

(21) N° d'enregistrement national :

**85 14106**

(51) Int Cl<sup>4</sup> : C 12 N 1/20; A 61 K 7/48, 35/74.

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 20 septembre 1985.

(71) Demandeur(s) : BREVIER Christiane. — FR.

(30) Priorité :

(72) Inventeur(s) : Jean Brevier.

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 21 du 22 mai 1987.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

(74) Mandataire(s) :

(54) Produit nouveau résultant de l'association d'un micro-organisme marin, avec de l'eau de mer appliquée en produits esthétiques en dermatologie, en cosmétologie, en pharmacie.

(57) Produit nouveau résultant de l'association d'un microorga-  
nisme marin (bactérie du genre « Halobactérium ») avec de  
l'eau de mer artificielle. L'éclatement de la paroi de la mem-  
brane plasmique par technique des ultra-sons permet de re-  
cueillir le contenu cytoplasmique des micro-organismes culti-  
vés.

Action protectrice au niveau de la peau pour combattre les  
effets secondaires des traitements dermatologiques.

FR 2 590 273 - A1

La présente invention est un produit nouveau résultat de l'association d'un micro-organisme marin, avec de l'eau de mer artificielle.

Bactérie sélectionnée pour ce produit :

Famille : Halobactériacae.

5 Type du genre : *Halobactérium* (Réf. : Elazani - Volcani 1957). Ce genre est très proche des *Pseudomonadaccae*. Il exige un minimum de sel de 15 gr. % pour se développer. Bâtonnet de 0,6 - 1,0 X 1,6 micron. Iso-lé. Reproduction par fission binaire. Mobile par ciliature polaire lophotriché. gram négatif. La structure est maintenue en présence de : mg cl 2 et ca 10 cl 2, Na, cl, k, indispensables à la conservation de la rigidité. L'ion essentiel reste le potassium, nécessaire au maintien de l'intégralité cellulaire, de la synthèse des protéines et autres activités enzymatiques intracellulaires.

Absence d'acide diaminopinélique et d'acide muramique.

Sur gélose, colonie de petite taille, convexes, régulières, translucides, puis colorées au fur et à mesure de l'élaboration des coroténoïdes. Métabolisme respiratoire, sucres non attaqués. Alcalinisation en présence des acides aminés. Le glucose et le glycérol font office de facteurs stimulants. Le glycérol à 2% est parfois acidifié. L'amidon n'est pas hydrolysé.

Elles ne contiennent pas d'acide muramique, ni diaminofimilique, elles 20 n'ont donc pas de paroi rigide.

Ces bactéries hyperhalophiles se lysent (lyse cellulaire) si les solutions dans lesquelles elles évoluent sont diluées. Les bâtonnets de celles-ci donnent naissance à des sphères qui ne tardent pas à éclater lorsque le taux de chlorure de sodium passe de 10 à 5%. Elles sont donc sensibles aux chocs 25 osmotiques.

Ces bactéries ne peuvent donc pas résister à la concentration saline des océans qui est trop faible, d'où leur rareté dans les mers. Les besoins en sels de ces bactéries croissent d'ailleurs avec les températures d'incubation des cultures température également favorable à leur croissance.

30 Les voies métaboliques de ces bactéries hyperhalophiles sont presque identiques à celles des autres bactéries. Elles manifestent une préférence pour les acides aminés, et une faible activité sur les sucres. Leur teneur en ADN et particulièrement *halobactérium salinarium* contient 15% de bases nucléiques avec 4,3 % d'ADN. Il faut éviter pour conserver cet ADN de manipuler *halobactérium salinarium* sans brutalité, car fragile, elles perdent leur ADN par ce choc. Les hydrates de carbone qu'elle contient se résume à 35 1,5 % de glucosamine. Les protéines varient entre 45 à 45 % de la masse totale. Un net excès de fonctions acides joue dans le maintien des structures. Ce type de bactérie possède de larges vacuoles cytoplasmiques gazeuses auxquel-

les on attribue la signification d'organelles de flottage.

L'arginine est indispensable à la croissance d'*halobactérium salinarium*, cet acide aminé est d'ailleurs dégradé en citrilline, puis ornithine. Le citrilline est un facteur de croissance pour *halobactérium salinarium*.

5 La culture des bactéries hyperhalophiles exige des milieux riches en tryptone, peptones, hydrolysats de caséine, autolysats de levure. Dans notre cas le bouillon nutritif que nous utilisons pour la culture de *halobactérium salinarium* contient tous ses éléments. Les sucres en général ne sont pas métabolisés, si quelquefois cela se produisait, la dégradation 10 serait lente ; protéines et amino-acides restent les éléments favorables au développement d'*halobactérium salinarium*.

*Halobactérium salinarium* se développe en 15 jours environ, maximum 20 Jours.

Les enzymes utiles pour *halobactérium salinarium* fonctionnent en présence de fortes concentrations salines, ce qui est notre cas, toutefois à 15 des concentrations plus faibles, des activités se manifestent encore.

Caroténoïde : le principal de ces pigments est représenté par la bactériopurpurine à 50 carbones et 4 hydroxyles.

De cette bactérie on a parfois extrait du squaline du dihydrosqualène et de la vitamine K8.

Les protéines et protéoses sont favorables à la croissance, à préférer aux peptones. Les milieux doivent être enrichis de NACL (3M) et de mg2 + puis de K+. T° de croissance 30-50°C avec optimum à 35-40°C. Aérobiose strict. PH 5,5 - 8,0. PH optimal : 7,2 - 7,4 espèce type sélectionnée : *halobactérium salinarium*.

Souche de référence : Lochead 91 - R6 NCR. 34002. (National Council Research, Ottawa, Canada).

Le pigment qui imprègne la membrane est rouge pourpre. Le glycérol à 0,1 % favorise la chromogénèse caractère fortement protéolytique.

30 Informations techniques :

La masse des bactéries marines cultivent à des T° d'incubation entre 10 et 25°C, l'optimum est de 15-18°C.

L'accroissement de la T° modifie les propriétés membranaires, agit sur le passage des substrats.

35 Les bactéries hyperhalophiles étant celles que nous avons choisi ont des mécanismes biologiques relativement spécifiques.

Les membranes de ces bactéries n'ont de 75 Å d'épaisseur.

Ces enzymes fonctionnent également en présence de fortes concentrations trouvées dans le cytoplasme. Les 3 éléments indispensables pour celle-ci

sont NA - K - CL que l'on trouvent bien entendu dans halobactérium salinarium et qui jouent un rôle dans le maintien de la stabilité de ces enzymes.

La protéolyse est active. Le PH optimal de halobactérium salinarium se situe entre 7,3 - 7,5. La concentration en NACL pour obtenir une bonne 5 culture de halobactérium est de 250 gr/litre.

Nous obtenons en regard de ce descriptif technique avec nos milieux de culture, un produit d'une richesse en protéine importante utile et nécessaire à la peau, pour son équilibre, un ensemble enzymatique qui va permettre de rétablir les fonctions de la peau atteintes par des stess ou des agents 10 intérieurs ou extérieurs qui se manifestent au niveau épidermique, de plus les micro-éléments ou oligo-éléments utiles également à la peau malade, fatiguée. Les micro-éléments ou oligo-éléments sont présents dans l'eau de mer synthétique, copie de la formule générale des composants de l'eau de mer naturelle.

15 Formule générale de ce produit :

- eau de mer synthétique (artificielle)
- composé de protéines, acides aminés, acides nucléiques, enzymes naturelles marins.
- oligo-éléments naturels marins
- 20 - macro-éléments naturels marins.

Présence de : magnésium, potassium, strontium, manganèse, lithium, sodium, bore, calcium, cobalt, aluminium, fer, rubidium, cuivre, zinc, iodé, sous forme de : chlorures, sulfates, fluorure, iodure.

Liste des milieux nécessaires.

25 Formule de l'eau de mer artificielle.

Pour une préparation de 40 litres.

1°) Partie :

COMPOSANT	QUANTITE	PURETE
Chlorure de magnésium	537 grs.	Qualité rigoureusement pure.
30 Chlorure de sodium ...	2,75 kg	qualité rigoureusement pure.
Sulfate de magnésium	687 grs	" " "
Chlorure de potassium	72,2 grs	" " "
Bicarbonate de sodium	20,6 grs	" " "
Chlorure de strontium	1,97 grs	Réactif analytique
35 Sulfate de manganèse	0,39 grs	" "
Chlorure de lithium	0,33 grs	" "
Molybdate de sodium	0,10 grs	" "
Phosphate disodique	0,10 grs	" "

## 2°) Partie

Acide borique	2,6 grs	qualité rigoureusement pure.
---------------	---------	------------------------------

Chlorure de calcium	2,950 Kg	qualité rigoureusement pure.
---------------------	----------	------------------------------

Mélanger les 2 parties dans 25 litres d'eau ultra pure, le récipient qui va recevoir l'eau et les différents éléments doit être stérile. Agiter jusqu'à complète dissolution.

## 3°) Partie

Gluconate de calcium	1,64 grs	Réactif analytique
----------------------	----------	--------------------

Iodure de potassium	0,237 grs	" "
---------------------	-----------	-----

Bromure de potassium	71 grs	" "
----------------------	--------	-----

Fluorure de potassium	0,200 grs	" "
-----------------------	-----------	-----

Dissoudre cette partie dans 2 litres d'eau ultra pure dans un récipient stérile. Agiter jusqu'à complète dissolution.

## 4°) Partie

Sulfate d'aluminium	1,15 grs	Réactif analytique
---------------------	----------	--------------------

Sulfate de cobalt	0,13 grs	Qualité rigoureusement pure.
-------------------	----------	------------------------------

Chlore de rubidium	0,39 grs	Réactif analytique
--------------------	----------	--------------------

Sulfate de cuivre	1,13 grs	Réactif analytique
-------------------	----------	--------------------

Sulfate de zinc	0,25 grs	" "
-----------------	----------	-----

Dissoudre cette partie dans 2 litres d'eau ultra pure et dans un récipient stérile. Agiter jusqu'à complète dissolution.

Prélever 25 Ml de chacune des solutions 3° et 4° partie avec des pipettes stériles. Ajouter ces prélèvements au résultat du mélange 1er et 2° partie. Agiter le tout pendant 10 mn environ. Il ne doit pas y avoir de dépôt à la fin de l'agitation.

Dans le cas contraire, continuez l'agitation jusqu'à complète dissolution.

Ajouter le reste du volume d'eau ultra pure pour obtenir 40 litres.

Agiter pendant 5 mn environ et vérifier s'il n'y a pas de dépôt ou de précipité qui se forme, sinon continuer à agiter jusqu'à complète dissolution. Agitation plus rigoureuse.

Milieux pour halobactérum salinarium.

Formule de gibbons.

Casamino acides..... 1 gr.

Extrait de levure..... 1 gr.

- Protéose peptone..... 0,5 grs  
 Citrate de Na..... 0,3 grs  
 Glutanate de Na..... 0,2 grs (facultatif).  
 K2 HP 04..... 0,1 grs ( " ).  
**5**  
 K Cl..... 0,2 grs  
 Mgs 04 7 H 2 0..... 2,5 Grs  
 Fe So 4..... Traces (0,005)  
 Fe Cl 2..... 0,0023 grs  
 Na Cl..... 23 grs  
**10**  
 Agar..... 2,5 grs  
 Eau ultra pure QSP 100 Ml  
 Stériliser cette formule à 120° pendant 10 minutes répartir en boites de roux ou flacons plat pour obtenir une grande surface . Refroidir en position inclinée.  
**15**  
 Milieu Na Cl 250 pour mettre en suspension la bactérie "Halobactérium Salinarium"  
 Pesar 250 grs de chlorure de sodium rigoureusement pure. Ajouter 1000 Ml d'eau ultra pure. Dissoudre jusqu'à complète dissolution. Le flacon récepteur du mélange doit être stérile. Stériliser à 120°C pendant 10 minutes  
**20** ce milieu.  
 Milieu nutritif (bouillon)  
 Tryptone caséine soja..... 5 grs.  
 Extrait de levure..... 2 grs  
 Extrait de viande..... 3 grs  
**25**  
 Eau de mer artificielle..... A Litre.  
 Stériliser aux conditions habituelles.  
 Technique de fabrication :  
 1) Prendre la souche pure à réception (Halobactérium salinarium) ouvrir le flacon ou le tube avec précaution et mettre à l'aide d'une pipette  
**30** stérile quelques gouttes du milieu pour mettre en suspension halobactérium salinarium, dans le flacon ou tube. Cette action aura pour effet de mettre en suspension cette bactérie.  
 Opérer dans un local stérile, ou sous hotte à flux laminaire pour éviter toute contamination venant de l'extérieur.  
**35**  
 2) Préparer auparavant la formule de gibbons. Calculer le nombre de de boites de roux ou de flacons plats que l'on désire produire, modifier alors les quantités des composants de la formule. Stériliser le tout à 120°C pendant 10 Mn.  
 Prendre le milieu stérile lorsqu'il commence à se trouver en tempé-

rature de 50°C environ, couler ce milieu dans le nombre de boites de roux ou de flacons plats qui ont été choisis. Laisser refroidir en position inclinée. Le tout doit être opéré dans un local stérile ou sans flux laminaire.

3) Reprendre "Halobactérium salinarium" mise en suspension par la 5 technique N°1 et répartir cette suspension en autant de parts égales, que l'on a de boites de roux coulées avec le milieu gibbons. Cette répartition, se fait après avoir mis la suspension dans le milieu NA CL 250 que l'on agitera doucement pendant 1 mm environ pour bien répartir les bactéries.

4) Il est conseillé de faire des répartitions de 20 à 25 ml par boite de roux ou flacons plats. Toujours sous flux laminaire et dans local stérile.

5) Les colonies vont se développer et apparaîtront à la lisière de séparation des deux phases solide et liquide, sur la frange qui marque cette frontière.

15 6) Les colonies ne développeront que vers le 15e jour parfois 3 semaines.

7) La température d'incubation est de 23°C.

8) Mettre toutes les boites ou flacons dans une étuve ventilée et dans un local stérile, cette bactérie à besoin d'une bonne aération. Ne pas 20 dépasser le T° d'incubation indiquée ci-dessus.

9) Vérifier le PH qui doit être de 7,3 à 7,5.

10) Laisser en incubation pendant 1 mois.

11) Prélever les colonies développées au niveau de la frange dans les boites de roux ou flacons plats. Les ensemencer stérilement sous flux laminaire ou dans local stérile, dans le milieu nutritif (bouillon) et dans des flacons types ballons, mettre à l'étuve ventilée.

12) laisser en contact 8 jours à T° d'incubation de 23°C.

13) Filtrer sur membrane (dans conditions stériles)

14) Récupérer le filtrat (dans conditions stériles)

30 15) Provoquer la rupture des membranes par technique ultra sonique intensité adaptée à l'éclatement de celle-ci à condition stérile.

16) Filtrer à nouveau sur membrane dans conditions stérile. Recueillir le filtrat et le mélanger à la solution d'eau de mer artificielle (synthétique) Conditions stériles.

35 17) Répartir ce produit final en récipient métal pour aérosol, l'intérieur possède un revêtement, afin d'éviter l'oxydation conditionner stérilement. La valve doit être étudiée pour une projection en brouillard.

18) Conditionné à l'azote (agent propulseur).

Si le produit final après contrôle de PH est trop alcalin, le PH à

obtenir étant de 7,5, ajouter de l'acide chlorydrique normal à la goutte et vérifier le PH à chaque fois après avoir agiter l'ensemble pendant quelques minutes (5 minutes) pour bien répartir l'acide. Si le PH est trop acide, utiliser la même technique que ci-dessus, mais prendre de la soude normale. Il 5 n'est pas utile pour rendre le PH à 7,3 de faire cette manipulation sur l'ensemble du volume de fabrication, il suffit de prélever auparavant sur le volume 100 Ml et traiter le produit comme indiqué ci-dessus. Ensuite faire le calcul de la quantité d'acide ou de soude à mettre en regard du volume total en tenant compte des 100 Ml prélever.

10 Attention ces manipulations doivent être faites avec beaucoup de soins.

Mode d'emploi :

15 Ce produit s'emploie uniquement en pulvérisation la valve de l'aérosol étant micronisée, la projection sur le visage s'effectue sous forme de brouillard (brumisation).

19 Ce produit n'est pas toxique, ne crée pas de risques secondaires à l'emploi conseillé.

20 Ce produit n'est pas un médicament, il n'y a pas de restriction particulière, le tenir à l'abri de la chaleur (+50°C) ne pas percer, ni brûler même après usage.

- Application du produit :

- Peaux irritées, fragiles,

25 - Rétablissement du déséquilibre de la peau, causé par la maladie, suivie à des traitements dermatologiques actifs, intenses, prolongés.

29 Rééquilibration des couches superficielles de la peau atteinte dans leurs fonctions par (soleil, vent, froid).

- Désincrustation

30 - Nettoyage apaisant, adoucissant, rafraîchissant, souplesse et élasticité.

- Facilite le bronzage.

- Respecte le film protecteur.

- Resserre les pores dilatés réduit l'excès du sébum.

35 - Apport des éléments actifs et bienfaits de la mer par la composition du produit.

- Eclaircissement du teint terne, éclat du visage.

- Respecte le PH de la peau.

39 - Acné juvénile chez l'adolescent dès l'apparition des éruptions cutanées.

## REVENDICATIONS

- 1) Produit nouveau résultant de l'association d'un micro-organismes marin avec de l'eau de mer artificielle.
- 2) Se caractérise par l'apport de protéines, acides aminés, acides nucléiques enzymes naturelles marines par le métabolisme du micro-organisme 5 cultivé sur milieux spécifiques.
- 3) Se caractérise par éclatement de la paroi, de la membrane plasmique par technique ultra sons pour receuillir le contenu cytoplasmique des micro-organismes cultivés.
- 4) Se caractérise par son action protectrice au niveau de la peau, 10 combattre les effets secondaires des traitements dermatologiques.
- 5) Ce produit est caractérisé en ce que sa présentation ne peut être autre qu'en aérosol, avec valve micronisée.

This Page Blank (uspto)